光枝勾儿茶内生真菌多样性及抑菌活性研究

周思旋[1]，张涛[1]，刘畅[2]，唐远江[1]，卢昱希[1]，杨粤黔[1]，余波[1]，史开志[1*]

（1. 贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所，贵阳 550005；2. 贵州中医药大学 药学院，药食两用资源应用与开发研究中心，贵阳 550025）

摘要：为探索贵州苗药光枝勾儿茶内生真菌类群特征、分布部位及其抑菌活性，该研究采用传统方法对贵州省贵阳市和黔西市光枝勾儿茶内生真菌进行分离，基于分子生物学及统计学对其分类地位进行鉴定及多样性评价，通过微量肉汤倍比稀释法筛选具有抑菌活性的菌株。结果表明：（1）从光枝勾儿茶中分离到 191 株内生真菌，隶属于 3 个门 5 个纲 10 个目 15 个科 19 个属，优势属为叶点霉属（*Phyllosticta*）、茎点霉属（*Diaporthe*）、葡萄座腔菌属（*Botryosphaeria*）和刺盘孢属（*Colletotrichum*）。（2）黔西光枝勾儿茶内生真菌 Shannon-Weiner 多样性指数（H'_{Q}=2.112）较贵阳（H'_{G}=1.801）高，相似性指数 $Cs_{G\text{-}Q}$ 为 0.923，不同部位 Shannon-Weiner 多样性指数为茎（H'_{S}=2.004）>根（H'_{R}=1.764）>叶（H'_{L}=1.654）>果实（H'_{F}=1.473），茎和叶内生真菌的相似性最高（$Cs_{S\text{-}L}$=0.667）。（3）筛选出 21 株内生真菌对供试菌大肠杆菌（*Escherichia coli*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）和沙门氏菌（*Salmonella enterica*）具有抑菌效果，其中 *Diaporthe* sp. QX4G6 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的最小抑菌浓度分别 12.5、6.25、12.5 $mg\cdot mL^{-1}$，最小杀菌浓度分别为 12.5、6.25、12.5 $mg\cdot mL^{-1}$。以上研究结果揭示了光枝勾儿茶蕴藏丰富的内生真菌资源，不同地区及部位内生真菌类群组成有差异，多个分离菌株具有抗菌活性，为光枝勾儿茶内生真菌天然抗菌药物或药源研发奠定了基础。

关键词：光枝勾儿茶，内生真菌，多样性，候选菌株，抑菌活性

中图分类号：Q939　　　　**文献标识码：**A

Diversity and antibacterial activity of endophytic fungi from Miao medicine *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*

ZHOU Sixuan[1], ZHANG Tao[1], LIU Chang[2], TANG Yuanjiang[1], LU Yuxi[1], YANG Yueqian[1], Yu Bo[1], SHI Kaizhi[1*]

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Guizhou Academy of Agricultural Sciences*, Guiyang 550005, China; 2. *Research Center for Application and Development of Medicine and Food Dual-use Resources, School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, Guiyang, 550025)

Abstract: To explore the fungal taxa, distribution and antibacterial activity of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*, endophytic fungi of *B. polyphylla* var. *leioclada* from Guiyang and Qianxi of Guizhou Province were isolated by tissue fragment separation. Based on the methods of molecular biology and statistics, the endophytic fungi were identificated and their diversity were analyzed. The strains with antibacterial activity were screened by microdilution of broth. The

---

收稿日期：2022-07-20

基金项目：国家自然科学基金（31960716）；黔农科院国基后补助（2021）49 号[Supported by National Natural Science Foundation of China(31960716); Post-subsidy Project of National Natural Science Foundation of China from Guizhou Academy of Agricultural Sciences(2021)49]。

第一作者：周思旋（1984-），博士，副研究员，研究方向为药用植物微生物资源分类及代谢产物研究，（E-mail）kerrybaiye@163.com。

*__通信作者：__史开志，硕士，研究员，研究方向为兽药资源开发与产业化研究，（E-mail）shkzjjp@163.com。

results were as follows: (1) There were 191 fungal strains were isolated, which classified into 3 phyla, 5 classes, 10 orders, 15 families and 19 genera. Among all strains, *Phyllosticta*、*Diaporthe*、*Botryosphaeria* and *Colletotrich*um were the dominant genus. (2) The fungal endophytes' Shannon-Weiner diversity index of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada* in Qianxi (H'_Q=2.112) was higher than Guiyang (H'_G=1.801), the Sorenson's similarity coefficients Cs_{G-Q} was 0.923. The Shannon-Weiner diversity index of different tissues was stem (H'_S =2.004)> root(H'_R=1.764)> leaf(H'_L=1.654)>fruit(H'_F=1.473). The Simpson was stem(D_S=0.826)>fruit(D_F=0.813)> root(D_S=0.765)>leaf(D_L=0.721), the similarity index between stem and leaf was the highest which was Cs_{S-L} =0.667. (3) 21 endophytic fungi' secondary metabolites have inhibitory effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. The isolate *Diaporthe* sp. QX4G6 fermentation broth extract have relatively high inhibitory effect, which the minimum inhibitory concentration against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* were 12.5, 6.25 and 12.5 mg·mL^{-1}, and the minimum bactericidal concentration were 12.5, 6.25 and 12.5 mg·mL^{-1}, respectively. The study revealed rich endophytic fungi resources of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada* and most of fungi have good antibacterial activity, which lay the foundation for the research and development of natural antibacterial drugs or drug sources for endophytic fungi from *B. polyphylla* var. *leioclada*.

Key words: *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*, endophytic fungi, diversity, candidate strains, antibacterial activity

植物内生真菌是指生活在植物细胞中或在其生活史某一时期生活在植物组织内，对植物组织没有引起明显病害的一类真菌（Petrini, 1991）。几乎所有植物都含内生真菌，分布于植物的根、茎、叶、花、果实等各个部位，种类和数量繁多，每一种植物都是内生真菌潜在的资源宝库（Zhou & Hyde, 2001）。随着内生真菌研究不断深入，不同植物的内生真菌组成不同，寄主植物种类、部位、环境和地理区域均是决定内生真菌种群结构的重要因素，目前从植物中分离出来的内生真菌种类繁多，涉及子囊菌、担子菌、接合菌、无孢菌等多种类群（谯利军等，2018；Bhattacharya et al., 2019；胡永志等，2021）。内生真菌与宿主植物长期协同进化，互惠共生，处于一种动态平衡的拮抗关系，有助于提高宿主对胁迫环境的适应性和抗性，在植物生长发育和繁殖中起到了重要作用（隋丽等，2021）。研究表明，从植物中分离到的内生真菌能产生丰富的次级代谢产物，包括生物碱、苯骈吡喃酮、黄酮、酚酸等多种类型化合物，对细菌、真菌、病毒等具有不同程度的拮抗作用，在药物研发、病害防治等方面表现中显著的经济价值和应用前景，是天然活性物质的重要来源（郭顺星，2018；Hanani et al., 2022）。内生真菌的存在及其发挥出来的优越性为寻找结构新颖、活性独特、替代药用植物的新药研发指明了方向。

光枝勾儿茶（*Berchemia polyphylla* var. *leioclada*）为鼠李科勾儿茶属植物，是贵州苗族习用药材，味苦、平，含苷类、醌类、木脂素类、萜类以及黄酮类等多种化学成分，具有抗氧化、抗肿瘤、抗腹泻、抗炎、镇痛、抑菌等活性，对治疗支气管炎、痢疾、关节炎等具有良好的效果，作为民族药物，可用于治疗人、畜肠炎及消化不良性腹泻（梁应林等，2013；唐远江等，2018）。目前已从该属植物中分离到 19 个已知化合物和 4 个蒽醌-苯并异色满苯醌二聚体，部分化合物显示了较好的对乙酰胆碱酯酶活性，体现了明显的研究价值（景永帅，2011）。然而，光枝勾儿茶生长周期长，产量低，易受环境地域等因素影响，传统植物开发应用受到了限制，其内生真菌作为植物的共生体和一种潜在的新资源，在寄主植物提供的营

养和保护下，经长期共同进化，可增强寄主植物的竞争能力和对食草动物、病原体和各种非生物胁迫的抵抗力，这种复杂多变的生境使内生真菌在生物制药、农业生产和工业发酵等方面表现出广阔的应用前景，是一类寻找结构新颖、活性独特物质和替代植物的重要来源（元超等，2021）。同时，内生真菌的开发应用可能实现大规模、低成本和无污染的工业化生产，为解决药用植物资源和环境保护提供了新途径。该研究基于光枝勾儿茶的药用价值及植物应用瓶颈，解析其内生真菌组成情况，设想能够通过筛选植物内生真菌抑菌活性，得到具有与植物产生功能相同或相似的次级代谢产物的微生物资源，从而部分替代植物来源生产临床天然药物。以贵州贵阳、黔西多年生光枝勾儿茶为研究对象，系统分离并鉴定根、茎、叶和果实等多个部位的内生真菌，在获得可培养真菌资源的基础上，采用分子生物学鉴定真菌类群，通过统计学方法对其进行多样性评价分析，以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌为指示菌，筛选具有抑制革兰氏阴、阳性两类细菌活性的内生真菌类群，为研发新型天然抑菌药物提供候选菌株，也为光枝勾儿茶进一步开发应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

分别采集贵州省贵阳市龙洞堡（106 47′26″ E，26 31′49″ N，海拔1 100 m）、黔西市（105 49′4 E，27 4′0″ N，海拔1 330 m）健康光枝勾儿茶样本11 株，其中贵阳6 株、黔西5 株，将采集的光枝勾儿茶植株放入采样袋带回实验室，24 h内进行内生真菌分离培养。植株经中山大学植物学廖文波教授鉴定为鼠李科植物光枝勾儿茶(*Berchemia polyphylla* var. *leioclada*)。

1.2 测试菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC 25922)标准株、沙门氏菌(*Salmonella enterica* ATCC 13076)标准株、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)标准株购自中国微生物菌种保藏中心。

1.3 内生真菌的分离纯化

将采集到的光枝勾儿茶样本冲洗干净并自然晾干，用无菌去离子水反复冲洗，无菌滤纸吸干水分，置于0.1%吐温80溶液中浸泡活化3~5 min，无菌水冲洗，无菌滤纸将水分吸干后于75%乙醇浸泡3 min，无菌水冲洗，用无菌滤纸吸干表面水分；采用70%乙醇+3% H_2O_2混合液消毒，无菌水冲洗3 次，无菌滤纸吸干，将叶、根、茎和果实剪成小组织块（0.5 cm × 0.5 cm），接种于含氯霉素（终浓度为20 μg·mL^{-1}）的PDA平板内，28 ℃恒温培养。为验证表面消毒是否有效，将表面消毒组织接种于含氯霉素PDA培养基上印记，同等条件下恒温培养，印记部位未见真菌生长则确认消毒彻底（Sanchez-Marouez et al., 2007）。随时观察，组织块边缘有菌丝长出时，采用针尖端菌丝挑取法，将菌丝转接于新的PDA平板，直至纯化获得形态均一菌落进行鉴定及保存。分离过程中详细记录组织块及分离菌株数量。

1.4 内生真菌的鉴定

纯化后的菌株参照《真菌学鉴定手册》（魏景超，1979），从形态学上初步判定菌株分类学地位。采用引物 ITS1/ITS4（White et al.,1990）对 ITS 基因序列进行扩增及测序。测序成功的 ITS 序列通过 BioEdit 分析软件校对、拼接、剪切，将剪切后的序列逐一通过 GenBank 数据库的 Blast 进行在线比对鉴定（Zhou et al., 2013），根据序列的相似度和覆盖率，结合菌株形态学特征确定各分离菌株归属，并根据 MycoBank（http://www.mycobank.org/ quicksearch.aspx）官网查询确认最新的内生真菌分类地位。

1.5 数据统计及多样性分析

通过数据统计，根据多样性评价指标，采用分离率（isolation rate, IR）、分离频率（isolation frequency, IF）、卡马戈指数（Camargo’s index）、多样性指数（Shannon-Weiner

diversity index, H'）、辛普森指数（Simpson index, D）及相似性指数（Sorenson's similarity coefficient, Cs）分析光枝勾儿茶植物内生真菌的多样性。

1.6 内生真菌体外抗菌活性筛选

1.6.1 菌株的选择及发酵产物制备

根据鉴定结果，选择分布于不同属 23 株分离菌，分别为 QX4G6、QX3Y2-5、QX5Y4-3、QX3J3-3、QX1Y1-1、QX3Y3-1、QX3J3-5、QX1G1-3、QX5G2-1、QX3J4-1、G2S12、G2S20、G2L17、D2S31、G3F4、D2S10、D2S25、D2S24、D3F3、G2S1、G2S11、D1S16 和 G3L5，采用 PDA 活化，待菌丝长满平板后，切成小块，接种于 PDB 培养基，于 28 ℃，120 $r \cdot min^{-1}$ 震荡培养 7 d 后，静置培养 30 d，发酵培养物用等体积乙酸乙酯萃取 3 次，合并萃取液，经旋蒸、干燥后，加入 MH 培养基稀释至浓度为 200 $mg \cdot mL^{-1}$ 的母液备用。

1.6.2 菌液制备

将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌接种于 MH 固体培养基上划线活化，置于 37 ℃培养 18 h，挑取单个菌落于含 MH 液体培养基的试管中，置于 37 ℃、120 $r \cdot min^{-1}$ 条件下振荡培养 12 h。用 MH 液体培养基调整菌液 OD_{600} 为 0.8 后稀释 1 000 倍，使菌液浓度为 10^5～10^6 $cfu \cdot mL^{-1}$，备用。

1.6.3 最小抑菌浓度（minimum inhibitory concentration, MIC）的测定

参考文献 Balouiri 等（2016）的方法，采用微量肉汤二倍稀释法，于无菌 96 孔板每孔中各加入 100 μL 肉汤培养基，分别向第 1 孔中加入 100 μL 配备好的药液，混匀后依次倍比稀释，直到第 9 孔混匀后弃去 100 μL 混合液。每孔加入上述配备好的 100 μL 细菌溶液。每板设置无药和空白对照组，观察细菌生长情况，37 ℃恒温培养 18 h 后取出，每个浓度做 3 次重复。

采用TTC（2,3,5－氯化三苯基四氮唑）法判定MIC结果。向上述培养18 h后的96 孔板每孔分别加入20 μL 0.5%的TTC，37 ℃避光培养1 h，观察菌液变化情况。试验样本溶液澄清、颜色未发生变化的最后1 孔药物浓度为该药的MIC。

1.6.4 最小杀菌浓度（minimum bactericidal concentration, MBC））的测定

将 1.6.3 试验组澄清的各孔中液体取 100 μL 涂布于 MH 固体培养基上，于 37 ℃培养 18~24 h 观察结果。肉眼观察无菌落生长的最低药物浓度为其 MBC。

2 结果与分析

2.1 光枝勾儿茶内生真菌组成

从贵阳及黔西光枝勾儿茶不同组织部位 780 个组织块中分离得到 191 株内生真菌，分离率为 24.49%（191/780），其中贵阳分离率为 24.30%（132/465），黔西为 24.76%（93/315）。PCR 产物序列经校对、拼接、剪切后，结合形态学和分子生物学对分离得到的内生真菌进行鉴定（表 1）。结果显示，分离菌株归属为 3 个门 5 个纲 10 个目 15 个科 19 个属。在贵阳和黔西分别分离得到 11 和 14 个属的菌株，其中：仅贵阳分离得到菌株隶属于 5 个属，分别为烟管菌属（*Bjerkandera*）、假囊酵母属（*Eremothecium*）、毛色二孢属（*Lasiodiplodia*）、歪嘴座壳属（*Pleurostoma*）和匍柄霉属（*Stemphylium*）；仅黔西分离得到 8 个属，分别为环纹碳团菌属（*Annulohypoxylon*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、微结节霉属（*Microdochium*）、毛霉属（*Mucor*）、新拟盘多毛孢属（*Neopestalotiopsis*）、拟盾壳霉属（*Paraconiothyrium*）、拟盘多毛孢属（*Pestalotiopsis*）和木霉属（*Trichoderma*）；贵阳和黔西共有属 6 个，分别为链格孢属（*Alternaria*）、葡萄座腔菌属（*Botryosphaeria*）、刺盘孢属（*Colletotrichum*）、茎点霉属（*Diaporthe*）、新壳梭孢属（*Neofusicoccum*）、叶点霉属（*Phyllosticta*）。其多样性分析结果表明，贵阳和黔西 Shannon-Weiner 多样性指数结果为黔西（H'_Q=1.801）>贵阳（H'_G=1.801），辛普森指数结果为黔西（D_Q=0.840）>贵阳（D_G=0.774），相似性指数

$Cs_{G\text{-}Q}$=0.923。

2.2 光枝勾儿茶内生真菌优势属的分离频率（IF）

试验分离所得菌株优势属依次为葡萄座腔菌属、刺盘孢属、茎点霉属和叶点霉属，分离率（IR）分别为5.90%（46/780）、4.87%（38/780）、4.1%（32/780）和3.59%（28/780），分离频率（IF）分别为24.08%（46/191）、19.89%（38/191）、16.75%（32/191）和14.66%（28/191）。从贵阳分离得到的优势属叶点霉属IR和IF最高，分别为9.46%（44/465）和39.94%（44/113），随后为茎点霉属，IR和IF分别为4.52%（21/465）和18.58%（21/113），葡萄座腔菌属IR和IF分别为4.09%（19/465）和16.81%（19/113）。从黔西分离得到的优势属为刺盘孢属，IR和IF最高，分别为6.35%（20/315）和25.64%（20/78），随后为茎点霉属IR和IF分别为5.40%（17/315）和21.79%（17/78）、葡萄座腔菌属IR和IF分别为4.13%（13/315）和16.67%（13/78）。

表 1　光枝勾儿茶内生真菌分离结果

Table 1　Isolation results of endophytes of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*

门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genera	菌株数 Number of strains 贵阳 Guiyang	菌株数 Number of strains 黔西 Qianxi	总计 Total	分离率 IR (%)	分离频率 IF (%)
子囊菌门 Ascomycota	座囊菌纲 Dothideomycetes	葡萄座腔菌目 Botryosphaeriales	葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae	葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*	19	13	32	4.10	16.75
				毛色二孢属 *Lasiodiplodia*	3	—	3	0.38	1.57
				新壳梭孢属 *Neofusicoccum*	4	6	10	1.28	5.24
			叶点霉科 Phyllostictaceae	叶点霉属 *Phyllosticta*	44	2	46	5.90	24.08
		格孢腔菌目 Pleosporales	隔孢假壳科 Didymosphaeriaceae	拟盾壳霉属 *Paraconiothyrium*	—	2	2	0.26	1.05
			孢腔菌科 Pleosporaceae	链格孢属 *Alternaria*	6	3	9	1.15	4.71
				匍柄霉属 *Stemphylium*	1	—	1	0.13	0.52
	子囊菌纲 Sordariomycetes	美球菌目 Calosphaeriales	歪嘴座壳科 Pleurostomataceae	歪嘴座壳属 *Pleurostoma*	5	—	5	0.64	2.62
		间座壳目 Diaporthales	间座壳科 Diaporthaceae	茎点霉属 *Diaporthe*	21	17	38	4.87	19.89
		肉座菌目 Hypocreales	丛赤壳科 Nectriaceae	镰刀菌属 *Fusarium*	—	2	2	0.26	1.05
			肉座菌科	木霉属	—	1	1	0.13	0.52

			Hypocreaceae	*Trichoderma*					
		小丛壳目 Glomerellales	小丛壳科 Glomerellaceae	刺盘孢属 *Colletotrichum*	8	20	28	3.59	14.66
		炭角菌目 Xylariales	炭角菌科 Hypoxylaceae	环纹碳团菌属 *Annulohypoxylon*	—	1	1	0.13	0.52
			微结节霉科 Microdochiaceae	微结节霉属 *Microdochium*	—	1	1	0.13	0.52
			圆孔壳科 Sporocadaceae	新拟盘多毛孢属 *Neopestalotiopsis*	—	2	2	0.26	1.05
				拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*	—	7	7	0.90	3.66
	酵母纲 Saccharomycetes	酵母目 Saccharomycetales	酵母科 Saccharomycetaceae	假囊酵母属 *Eremothecium*	1	—	1	0.13	0.52
毛霉菌门 Mucoromycota	毛霉菌纲 Mucoromycetes	毛霉菌目 Mucorales	毛霉菌科 Mucoraceae	毛霉属 *Mucor*	—	1	1	0.13	0.52
担子菌门 Basidiomycota	伞菌纲 Agaricomycetes	多孔菌目 Polyporales	白腐菌科 Phanerochaetaceae	烟管菌属 *Bjerkandera*	1	—	1	0.13	0.52
总计 Total					113	78	191	24.49	100

2.3 不同组织部位内生真菌多样性分析

从光枝勾儿茶不同组织部位分离内生真菌分析结果表明（表 2），根、茎、叶和果实分离菌分别分布于 9、13、11 和 6 个属，4 个组织部位均分离到共有属葡萄座腔菌属、刺盘孢属和茎点霉属。新壳梭孢属为根、茎、叶共有属，链格孢属和歪嘴座壳属为茎、叶、果实共有属，毛色二孢属和叶点霉属为茎和叶共有属，镰刀菌属、新拟盘多毛孢属和拟盘多毛孢属为根和茎共有属。仅从根中分离得到 2 个属，分别为毛霉属和木霉属；仅从茎中分离到 2 个属，包括匍柄霉属和微结节霉属；仅从叶中分离到 3 个属，包括拟盾壳霉属、环纹碳团菌属和烟管菌属；仅从果实中分离到 1 个属为假囊酵母属。

表 2　光枝勾儿茶不同组织部位内生真菌分布情况

Table 2　Distribution of endophytic fungi from different tissues of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*

属 Genera	菌株数　Number of strains				合计
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	果实 Fruit	Total
葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*	5	22	3	2	32
毛色二孢属 *Lasiodiplodia*	—	2	1	—	3
新壳梭孢属 *Neofusicoccum*	2	6	2	—	10
叶点霉属 *Phyllosticta*	—	22	24	—	46
拟盾壳霉属 *Paraconiothyrium*	—	—	2	—	2
链格孢属 *Alternaria*	—	7	1	1	9
匍柄霉属 *Stemphylium*	—	1	—	—	1
毛霉属 *Mucor*	1	—	—	—	1
刺盘孢属 *Colletotrichum*	1	6	19	2	28
镰刀菌属 *Fusarium*	1	1	—	—	2
木霉属 *Trichoderma*	1	—	—	—	1
歪嘴座壳属 *Pleurostoma*	—	2	2	1	5
茎点霉属 *Diaporthe*	11	23	3	1	38
微结节霉属 *Microdochium*	—	1	—	—	1
新拟盘多毛孢属 *Neopestalotiopsis*	1	1	—	—	2
拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*	4	3	—	—	7
环纹碳团菌属 *Annulohypoxylon*	—	—	1	—	1
假囊酵母属 *Eremothecium*	—	—	—	1	1
烟管菌属 *Bjerkandera*	—	—	1	—	1
总计 Total	27	97	59	8	191

光枝勾儿茶不同组织部位 Shannon-Weiner 多样性指数结果分析表明，茎（H'_S=2.004）>根（H'_R=1.764）>叶（H'_L=1.654）>果实（H'_F=1.473），辛普森指数结果为茎（D_S=0.826）>果实（D_F=0.813）>根（D_S=0.765）>叶（D_L=0.721）。茎和叶所得内生真菌的相似性最高 $Cs_{S\text{-}L}$=0.667，其次为 $Cs_{R\text{-}S}$=0.636，相似性最低的为根和果实 $Cs_{R\text{-}F}$=0.267（表 3）。

表 3　光枝勾儿茶不同组织部位内生真菌多样性指数

Table 3 Diversity indexes of endophytic fungi from *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*

组织 Tissue	香农-威纳多样性指数 Shannon-Weiner diversity index (*H'*)	卡马戈指数 Camargo's index	辛普森指数 Simpson index (*D*)	相似性指数 Sorenson's similarity coefficient (*Cs*)		
				茎 Stem	叶 Leaf	果实 Fruit
根 Root	1.764	0.111	0.765	0.636	0.400	0.267
茎 Stem	2.004	0.077	0.826	—	0.667	0.526
叶 Leaf	1.654	0.091	0.721	0.667	—	0.588
果实 Fruit	1.473	0.167	0.813	0.526	0.588	—
总计 Total	2.161	0.053	0.845	—	—	—

2.4 内生真菌次级代谢产物抑菌活性筛选

选择的 23 株菌株次级代谢产物抑菌活性测定结果表明，其中 20 株内生真菌液体发酵提取物对 3 株细菌均表现出一定的抑菌作用，MIC 介于 6.25~100 mg·mL^{-1}，1 株内生真菌 QX3J4-1 仅对大肠杆菌有抑菌作用，2 株菌株液体发酵提取物对供试菌株未见明显抑菌效果。菌株 QX4G6、G3F4 和 D2G24 对大肠杆菌抑菌效果较好，MIC 均为 12.5 mg·mL^{-1}；QX4G6、G2S12 和 G3F4 对金黄色葡萄球菌抑菌效果较好，MIC 均为 6.25 mg·mL^{-1}；菌株 QX4G6、QX1Y1-1、G3F4、D2G24 和 G2S1 对沙门氏菌抑菌效果较好，MIC 均为 12.5 mg·mL^{-1}（表 4）。

20 株内生真菌液体发酵提取物对 3 株供试细菌 MBC 介于 6.25~100 mg·mL^{-1}，1 株内生真菌 QX3J4-1 仅对肠杆菌有杀菌作用，2 株菌株液体发酵提取物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及沙门氏菌无杀菌作用。其中，菌株 QX4G6 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌杀菌效果最好，MBC 分别为 12.5、6.25、12.5 mg·mL^{-1}，其余菌株液体发酵提取物 MBC 大于或等于 25 mg·mL^{-1}（表 4）。

表 4　光枝勾儿茶内生真菌次级代谢产物对 3 种病原菌抑菌活性结果

Table 4 Antibacterial activity of the secondary metabolites of endophytic fungi from *Berchemia polyphylla* var. *leioclada* against three tested pathogenic bacterium

菌株名称 Strain name	MIC (mg·mL^{-1})			MBC (mg·mL^{-1})		
	大肠杆菌 *Escherichia coli*	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	沙门氏菌 *Salmonella enterica*	大肠杆菌 *Escherichia coli*	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	沙门氏菌 *Salmonella enterica*
QX4G6	12.5	6.25	12.5	12.5	6.25	12.5
QX3Y2-5	25	25	25	25	12.5	50
QX5Y4-3	50	25	50	50	100	50
QX3J3-3	50	25	50	50	25	50
QX1Y1-1	25	12.5	12.5	25	12.5	50
QX3Y3-1	—	—	—	—	—	—
QX3J3-5	25	12.5	25	50	25	50
QX1G1-3	25	12.5	25	50	50	50
QX5G2-1	25	25	25	25	25	25
QX3J4-1	100	—	—	100	—	—
G2S12	50	6.25	50	50	12.5	50
G2S20	25	12.5	25	25	25	25
G2L17	50	25	50	50	25	50
D2S31	50	50	50	100	100	100
G3F4	12.5	6.25	12.5	25	25	25
D2S10	50	25	50	50	50	100
D2S25	25	25	25	50	25	25
D2S24	12.5	12.5	12.5	50	12.5	12.5
D3F3	—	—	—	—	—	—
G2S1	25	12.5	12.5	25	25	25
G2S11	25	12.5	25	25	50	50
D1S16	25	12.5	25	25	25	50
G3L5	25	25	25	25	25	25

3 讨论与结论

目前内生真菌以组织块分离法为主，一方面获得可培养内生真菌类群，另一方面为后续内生真菌的开发利用提供资源。该研究以生境不同的贵州贵阳和黔西光枝勾儿茶为研究对象，从 780 个植物组织块中共分离到 191 株可培养内生真菌，其中子囊菌为 190 株，占绝对优势，仅鉴定到 1 株担子菌。目前报道的植物内生真菌类群文献，大多以子囊菌为主，这可能与植物内部环境有关，也可能是受分离方法或者物种差异所限（Gaur et al., 2021）。属水平上，葡萄座腔菌属、刺盘孢属、茎点霉属和叶点霉属为光枝勾儿茶的优势属，主要分布在叶和茎中。本次分析结果发现贵阳和黔西分离到的菌株类群具有一定的相似性和差异性，茎和叶所得内生真菌的相似性最高，不同组织之间菌株类群也存在差异，茎中内生真菌群落 Shannon-Weiner 多样性指数最高，果实最低，表明内生真菌在植物中表现出一定的组织特异性和偏好性。宋静静等（2022）从广西夹竹桃中分离的内生真菌中，刺盘孢属和球座

菌为优势属，主要分布于茎和叶，与本次研究对象内生真菌分布相同。吕佳等（2022）研究发现广东肉桂叶、枝、根和皮中均有内生真菌分布，叶的 Shannon-Weiner 多样性指数最高。贵州马尾松的根部内生真菌多样性最高，其次是茎，最后是叶，茎与根内生真菌相似性最高（罗鑫和于存，2021）。以上结果表明，本次采集样本地贵阳和黔西，两地海拔、光照、气温及降雨不同，其内生真菌的组成可能受到地域的影响；同一植物不同组织也可能受光照、温度、湿度等影响因素，致使其内生真菌产生组织分布差异。因此，在进行植物内生真菌的研究中，应尽量多地域、多部位进行菌株分离，以更全面的体现植物内生真菌的分布及多样性。此次研究结果首次分离得到贵州光枝勾儿茶内生真菌可培养菌株，揭示了贵州光枝勾儿茶内生真菌类型及分布特性，为进一步探究内生真菌物种次级代谢产物活性方面提供了素材，同时也为下一步植物与内生真菌之间的相互影响研究奠定了基础。

研究通过测试 23 株不同类群内生真菌对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的抑制活性，筛选到 21 株菌株具有不同程度的抑菌活性的内生真菌菌株，对 3 种测试菌均有抑菌活性的有 20 株，分别分布于茎点霉属、叶点霉属、镰刀菌属、刺盘孢属及烟管菌属等多个类群，此结果表明光枝勾儿茶内生真菌在医药开发方面存在较大的潜在研究及应用价值。从黔西光枝勾儿茶的根部中分离到的茎点霉属菌株 *Diaporthe* sp. QX4G6 提取物抑菌效果最好，据文献报道，茎点霉属是活性代谢产物较为丰富的真菌类群，广泛分布于世界各地和多种植物，目前已从该属内生真菌中分离出了 200 多个化合物，包括聚酮类、生物碱类、萜类、蒽醌类、羟基化不饱和脂肪酸等，其中部分化合物显示出抗菌、抗肿瘤、抗高血脂症、抗寄生虫、抗氧化及保护植物等生物活性（蔡佳等，2021）。Li 等（2015）从 *Diaporthe* sp. LG23 代谢产物中分离得到 1 个新羊毛脂甾烷型四环三萜化合物 19-nor-lanosta-5，对革兰氏阴、阳性细菌均表现出明显的抗菌作用，Nishad 等（2021）从内生真菌 *Diaporthe longicolla* 粗提物中分离得到 2,4-di-tert-butyl phenol 单体化合物，对金黄色葡萄球菌抑菌活性明显。基于上述研究基础及应用前景，茎点霉属真菌类群独特的次级代谢产物生产能力成为了活性化合物的重要潜在来源之一，作为候选菌株获得活性物质是未来一大研究方向（Nagarajan et al., 2021）。试验结果分离菌株虽表现出广谱的抑菌活性，但 MIC 和 MBC 值不够理想，推荐分析可能因多个物质之间作用对结果产生了一定的干扰。为进一步追踪活性物质来源，下一步研究将 *Diaporthe* sp. QX4G6 做为目标菌株进行大量发酵，通过化学手段进行结构鉴定，测定评价每个单体物质的抑菌活性，以筛选获得具有显著抑菌活性的单一化合物，为药物先导分子的挖掘提供备选药源，具有重要的科学意义和潜在的应用价值。

参考文献：

BALOUIRI M, SADIKI M, IBNSOUDA SK, 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review [J]. J Pharm Anal, 6(2): 71-79.

BHATTACHARYA S, DEBNATH S, DAS P, et al., 2019. Diversity of fungal endophyte of *L.* var. *kew* from Unokoti district, *Ananus comosus* Tripura with bioactive potential of *Neopestalotiopsis pieana* [J]. AJPP, 5(2): 353-360.

CAI J, ZHOU WY, XU GM, et al., 2021. Research progress on natural products of fungi of *Diaporthe* sp. [J]. Chin J Chin Mat Med, 46(7): 1717-1726. [蔡佳，周雯颖，许光明，等，2021. 间座壳属 *Diaporthe* sp.真菌的天然产物研究进展 [J]. 中国中药杂志，46(7): 1717-1726.]

GAUR A, PARKASH V, KUMAR V, et al., 2021. Endophytic fungal diversity associated with roots of *Angelica glauca*: An endangered medicinal plant of Northwest Himalaya [J]. Asian J Mycol, 4(2): 144-158.

GUO SX, 2018. The recent progress and prospects of research on endophytic fungi in medicinal plants [J]. Mycosystema, 37(1): 1–13. [郭顺星，2018. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势 [J]. 菌物学报, 37(1): 1–13.]

HANANI A, VALENTINI F, SANZANI SM, et al., 2022. Community analysis of culturable sapwood endophytes from Apulian olive varieties with different susceptibility to *Xylella fastidiosa* [J]. Agronomy, 12(1): 9.
HU YZ, YANG XF, ZHOU YQ, et al., 2021. Genetic diversity and antibacterial activity of endophytic fungi from *Zanthoxylum nitidum* [J]. Chin J Chin Mat Med, 46(13): 3349-3355. [胡永志，杨鑫凤，周雅琴，等，2021. 两面针内生真菌遗传多样性分析及其抗菌活性研究 [J]. 中国中药杂志，46(13):3349-3355.]
JING YS, YANG J, WANG Y, et al., 2011. Anthraquinone-benziso chromanquinone Dimers from *Berchemia polyphylla* var. *leioclada*[J]. Chin Acad J,46(9):661-664. [景永帅，杨娟，汪治，等，2011. 光枝勾儿茶中蒽醌-苯并异色满苯醌二聚体成分 [J]. 中国药学杂志，46(9): 661-664.]
LI G, KUSARIS, KUSARIP, et al., 2015. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid [J]. J Nat Prod, 78(8): 2128.
LIANG YL, LI ZB, YANG MS, 2013. The influences of Guizhou antidiarrheal herbs on piglet diarrhea prevention [J]. Hubei Agric Sci, 52(22): 5535-5538. [梁应林，李仲佰，杨茂生，2013. 贵州止泻草药对预防仔猪腹泻效果的影响 [J]. 湖北农业科学，52(22): 5535-5538.]
LÜ J, LUO B, QIAN JP, et al., 2022. Diversity of endophytic fungi from *Cinnamomum cassia* and their antagonism to the pathogen of *C. cassia* branch blight in Guangdong, South China [J]. Mycosystem, 41(3): 435-449. [吕佳，罗碧，钱家萍，等. 2022. 广东肉桂内生真菌多样性及其抗肉桂枝枯病菌初步研究 [J]. 菌物学报，41(3): 435-449.]
LUO X, YU C, 2021. Diversity of endophytic fungi from *Pinus massoniana* in Guizhou Province, southwestern China [J]. Mycosystema, 40(3): 531-546. [罗鑫，于存，2021. 贵州马尾松内生真菌多样性 [J]. 菌物学报，40(3): 531-546.]
NAGARAJAN K, TONG WY, LEONG CR, et al., 2021. Potential of endophytic *Diaporthe* sp. as a new source of bioactive compounds [J]. J Microbiol Biotechnol, 31(4): 493-500.
NISHAD JH, SINGH A, GAUTAM VS, et al., 2021. Bioactive potential evaluation and purification of compounds from an endophytic fungus *Diaporthe longicolla*, a resident of *Saraca asoca* (Roxb.) Willd [J]. Arch Microbiol, 203: 4179–4188.
PETRINI O, 1991. Fungal endophytes of tree leaves [J]. Microb Ecol Leaves: 179－197. DOI: 10.1007/978-1-4612-3168-4_9
QIAO LJ, ZHOU SX, WEN TC, et al., 2018. Diversity of endophytic fungi from *Nothapodytes pittosporoides* in Guizhou Province [J]. Mycosystema, 37(1): 43-51. [谯利军，周思旋，文庭池，等，2018. 贵州马比木内生真菌的多样性研究 [J]. 菌物学报，37(1): 43-51.]
SANCHEZ-MARQUEZ S, BILLS GF, ZABALGOGEAZCOA I, 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata* [J]. Fungal Divers, 27: 171–195.
SONG JJ, LUO MD, LI L, et al., 2022. Diversity of endophytic fungi isolated from *Nerium indicum* in Guangxi and activity screening of inhibiting several aquatic pathogen [J]. Guihaia, http://kns.cnki.net/kcms/detail/45. 1134.Q.20220214.1125.004.html. [宋静静，罗美苗，李露，等，2022. 广西夹竹桃内生真菌的多样性和抑制几种水产病原菌活性筛选 [J]. 广西植物，http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20220214. 1125.004.html.]
SUI L, WAN TY, LU Y, et al., 2021. Review of fungal endophytes on plant growth promotion and stress resistance [J]. Chin J Biol Control, 37(6): 1325-1331. [隋丽，万婷玉，路杨，等，2021. 内生真菌对植物促生、抗逆作用研究进展 [J]. 中国生物防治学报，37(6): 1325- 1331.]
TANG YJ, SHANG YS, ZHOU SX, et al., 2018. Research progress of *Berchemia polyphylla* var. *leioclada* [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, (6): 164-167. [唐远江，尚以顺，周思旋，等，

2018. 光枝勾儿茶的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医，(6): 164-167.]

WEI JC, 1979. Fungal identification manual [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technical Press: 1-780. [魏景超，1979. 真菌鉴定手册 [M]. 上海：上海科学技术出版社：1-780.]

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols, 18: 315-322.

YUAN C, SHU XC, ZHANG YB, et al., 2021. Antibacterial and anti-anthracnose activities of endophytic fungi colonized in *Blumea balsamifera* (L.) DC. [J]. Chin Agric Sci Bull, 37(23): 38-44. [元超，舒雪纯，张影波，等，2021. 艾纳香内生真菌抗细菌和炭疽菌的活性研究 [J]. 中国农学通报，37(23): 38-44.]

ZHOU D, HYDE KD, 2001. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi [J]. Mycol Res, 105:1449–1457.

ZHOU SL, YAN SZ, WU ZY, et al., 2013. Detection of endophytic fungi within foliar tissues of *Camellia oleifera* based on rDNA ITS sequences [J]. Mycosystema, 32(5): 819-830.